

P22033.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :H. YANAGAWA et al.

Appl No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

I.A. Filed : August 31, 2000

PCT/JP00/05920

For :METHOD FOR ANALYZING INTERACTION BETWEEN PROTEIN AND  
MOLECULE

**CLAIM OF PRIORITY**

Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 11-244704, filed August 31, 1999. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,  
H. YANAGAWA et al.

Bruce H. Bernstein  
Reg. No. 29,027

February 27, 2002  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1941 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191

*33,084*

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/069,111

JP00/05920

PCT/JP 00/05920

31.08.00

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

10/059111	
REC'D 18 SEP 2000	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

ESU

出願年月日  
Date of Application:

1999年 8月31日

8/3

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第244704号

出願人  
Applicant(s):

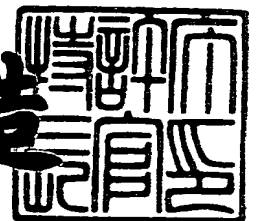
三菱化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3059674

【書類名】 特許願

【整理番号】 J04120

【提出日】 平成11年 8月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 タンパク質－分子間相互作用解析法

【請求項の数】 22

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市南大谷 1 1 号 株式会社三菱化学生命科学  
研究所内

【氏名】 柳川 弘志

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市南大谷 1 1 号 株式会社三菱化学生命科学  
研究所内

【氏名】 根本 直人

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100103997

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 暁司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035035

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質－分子間相互作用解析法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質の C 末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、コーディング領域を含む DNA から転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中で合成される、C 末端がラベル化されたタンパク質を用いて、該タンパク質と相互作用する分子を同定する方法。

【請求項 2】 該分子がタンパク質、核酸、糖類または脂質である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 該ラベル化試薬のラベル部が、蛍光性物質、放射性物質または非放射性標識物質である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 該非放射性標識物質がビオチンである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 該ラベル化試薬のアクセプター部が、核酸または核酸誘導体である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 該核酸誘導体が、核酸とアミノ酸またはアミノ酸誘導体とが結合した化合物である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 該核酸誘導体が、ピューロマイシンまたはピューロマイシン誘導体である請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】 無細胞翻訳系が、大腸菌 S 3 0 抽出液、小麦胚芽抽出液またはウサギ網状赤血球抽出液を使用する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 C 末端がラベル化されたタンパク質と相互作用する分子の同定が蛍光の物理量変化によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 0】 蛍光の物理量変化が蛍光の偏光、強度または時間依存である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】 相互作用する分子の同定が、蛍光偏光解消法または蛍光相関分光法によって行われる請求項 9 または 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】 C 末端がラベル化されたタンパク質と相互作用する分子の同

定が、蛍光以外の物理量変化によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】 相互作用する分子の同定に、表面プラズモン共鳴装置を使用する請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質の C 末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とがスパーサを介して結合したラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、コーディング領域を含む DNA から転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中で合成された、C 末端がラベル化されたタンパク質が、センサーチップ上を被覆した、該タンパク質のラベル部に結合する物質に結合してなるセンサーチップに固定化された該タンパク質と相互作用する分子を、このチップを取り付けた表面プラズモン共鳴装置で、応答シグナルの時間変化を追跡することにより同定する請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】 相互作用する分子が、C 末端がラベル化されたタンパク質である請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質の C 末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とがスパーサを介して結合したラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、コーディング領域を含む DNA から転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中で合成された、C 末端がラベル化されたタンパク質が、メンブレンまたはマイクロプレート上を被覆した、該タンパク質のラベル部に結合する物質に結合してなるマイクロアレイを用いて該タンパク質と相互作用する分子を同定する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】 ラベル部がビオチンであり、アクセプター部がピューロマイシンであり、スパーサが高分子化合物であり、ラベル部に結合する物質がアビジンまたはストレプトアビジンである、請求項 1 4 - 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】 高分子化合物が、ポリエチレンまたはポリエチレングリコールである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】 センサーチップ上のタンパク質に結合するタンパク質、核酸

、糖類または脂質を検出する請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】 マイクロアレイ上のタンパク質に結合するタンパク質、核酸、糖類または脂質を検出する請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1】 該タンパク質、核酸、糖類または脂質の検出が固相酵素免疫検定法で行われる請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】 該タンパク質または核酸の検出が、該マイクロアレイに C 末端が蛍光ラベル化されたタンパク質を加え、洗浄後蛍光イメージアナライザーを用いて行われる請求項 2 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、タンパク質の C 末端をラベル化試薬により効率的にラベル化して得られる、C 末端がラベル化されたタンパク質と相互作用する分子を同定する方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、C 末端が特異的にラベル化されたタンパク質を用いることにより、他分子との相互作用などのタンパク質の機能を迅速に解析する方法に関する。本発明は、現在、急速に蓄積している遺伝子配列がコードするタンパク質の機能解析、たとえばタンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-核酸相互作用等の解析を迅速化するための手段を提供する。また、本発明は、遺伝子解析において不可欠な大量のデータを迅速に解析するハイスループット化（効率化および自動化）における有力な手段を提供する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

分子生物学の進歩により、個々の遺伝子産物の解析が容易となった結果、生命現象を分子レベルで解析することが可能となった。たとえば、タンパク質・タンパク質相互作用やタンパク質・核酸相互作用等の解析による生化学的機能解析を通して、遺伝子機能が解析される。

【0 0 0 3】

タンパク質・タンパク質相互作用の解析には、イーストツーハイブリッド (yeast two hybrid) 法、GST-融合タンパク質プルダウン法、免疫共沈法などが



知られている。イーストツーハイブリッド法では、酵母の転写因子である Gal 4 や Lex 系が使用される。たとえば、Gal 4 の結合ドメインと転写活性化ドメインとを利用して、目的とする 2 つのタンパク質をそれぞれ融合タンパク質として発現させ、2 つのタンパク質の相互作用によって Gal 4 の結合ドメインと転写活性化ドメインとがコンプレックスを形成することにより出現する、転写活性を測定する。プロモータ活性は、Lac Z 遺伝子をプロモータ下流に結合することにより、Lac Z 活性として検出される。

## 【0004】

GST-融合タンパク質プルダウン法では、試験管内で反応が行われるのに対し、イーストツーハイブリッド法および免疫共沈法では、細胞内での相互作用が検出される。しかし、いずれの方法も、タンパク質・タンパク質相互作用の検出感度および特異性には限界がある。

## 【0005】

タンパク質・核酸相互作用は、電気泳動移動度シフトアッセイ (electrophoresis mobility shift assay) 法、DNアーゼ I フットプリント法、メチル化緩衝法等により検出される。電気泳動移動度シフトアッセイ (electrophoresis mobility shift assay) 法では、タンパク質・DNA 相互作用の解析が可能である。

## 【0006】

該方法では、プロモータ内の転写因子結合配列を含む DNA 断片を  $^{32}\text{P}$  で標識してプローブとし、核タンパク質あるいは特定の転写因子である組換えタンパク質と反応させ、次いでポリアクリルアミドゲル電気泳動で検出する。タンパク質・DNA 相互作用が存在すると、移動度の異なるバンドが検出される。この方法によれば、タンパク質の認識する DNA 配列、タンパク質内の DNA 結合ドメインを解析できる。

## 【0007】

遺伝子産物を同定することにより、遺伝子の機能を解析する方法も知られている。この遺伝子機能解析法では、無細胞翻訳系や生細胞で発現させた、遺伝子産物であるタンパク質を  $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$  等の放射能性同位元素でラベルしたアミノ酸を翻訳産物に取り込ませる放射能ラベル化法が一般的である。この場合、放

射能を利用するため安全管理上、特別な施設等が必要とされる。このため、放射能化合物を利用しない方法として下記する方法が知られている。この方法によれば、まず、アミノ酸のリジンの $\epsilon$ -アミノ基にビオチンを共有結合させ、これをリジンのアンチコドンをもつ tRNA にエステル結合させたもの（ビオチン-リジン-tRNA）を合成し、無細胞翻訳系に投入し、翻訳産物をビオチン化する。

## 【0008】

翻訳産物は、電気泳動後、メンブレンに移し、アルカリフォファターゼとストレプトアビジンとの融合タンパク質によって、翻訳産物をアルカリホスファターゼにより化学発光させる。これを、X線フィルム等を使って、翻訳産物を同定する（Promega 社、(1993) Technical Bulletin, No.182, p2）。この方法は、合成したビオチン-リジン-tRNA が極めて不安定（ $-70^{\circ}\text{C}$  で6カ月）であり、高価であるという欠点を有する。さらに、翻訳されたタンパク質は、複数のリジン側鎖がビオチンで修飾され、しかも、その修飾される側鎖は各分子ごとに異なるため、同一の遺伝子から翻訳されたにも関わらず、機能および構造が本来のものとは異なる複数の翻訳産物が得られる。そのため、タンパク質の機能解析を極めて難しいものとする。

## 【0009】

また、タンパク質のアミノ酸の $\text{NH}_2$ 、SH、OH基に、直接、化学的に蛍光物質を結合させる方法が複数知られている（PanVera 社、(1998) Fluorescence Polarization Applications Guide Chapter 7）。しかし、これらの方法はどれもタンパク質を変性させる条件下で化学結合させるため、タンパク質の構造および機能を著しく変化させる可能性が高い。しかも、蛍光物質がタンパク質の側鎖に部位特異的に結合することなく、複数の側鎖に非特異的に結合するため、本来のものとは構造および機能が異なるタンパク質が複数存在することになり、タンパク質の機能解析において正確な情報が得られない。さらに、この化学修飾法においては、目的のタンパク質の精製操作が不可欠である。

## 【0010】

ピューロマイシンは、アミノアシル-tRNA と競合し、リボソームのAサイ

トに入り、タンパク質合成を阻害する。本発明者等は、比較的低濃度のピューロマイシンが、全長タンパク質のC末端に付加することを見出した。そこで、ピューロマイシンに蛍光分子のフルオレセインを共有結合させた分子 (Fluorpuro) を合成し、これを無細胞翻訳系に投入すると、合成された全長タンパク質が蛍光ラベル化されることを見出した。さらに、終止コドンに欠失させた mRNA を用いると、通常の mRNA を用いた場合に比し、効率が 5 - 20 倍、ラベル化効率が 50 - 95 % になることを見出した。

【0011】

以上のように、公知のタンパク質のラベル化法には多くの問題点があるために、蛍光偏光解消法のように、迅速にタンパク質-分子間相互作用を解析する手段が存在するにも関わらず、これを有効に利用することができなかった。また、利用できるとしても、多大な労力と経験、時間が必要である。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、C末端がラベル化されたタンパク質を用いる、タンパク質の機能解析において、ラベル化されたタンパク質が構造、機能を保持しており、機能解析が迅速、かつ簡易であり、また経済的で、安全である、タンパク質-分子間相互作用解析法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、コーディング領域を含むDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中で合成される、C末端がラベル化されたタンパク質を用いると、該タンパク質と相互作用する分子を簡易、迅速に同定できることを見出し本発明を完成するに至った。

【0014】

具体的には、本発明の方法では、ゲル濾過やアフィニティークロマトグラフィー

等によって、タンパク質中に取り込まれなかったラベル化試薬をこの転写産物から除去し、次いで蛍光分光器等を用いて、ラベル化タンパク質の純度を検定、定量し、さらに定量したラベル化タンパク質に対し相互作用を調べようとする分子を順次加え、蛍光偏光解消法等により、タンパク質-分子間相互作用を迅速に解析する。

すなわち、本発明は、

【0015】

(1) 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、コーディング領域を含むDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中で合成される、C末端がラベル化されたタンパク質を用いて、該タンパク質と相互作用する分子を同定する方法。

(2) 該分子がタンパク質、核酸、糖または脂質である1項に記載の方法。

(3) 該ラベル化試薬のラベル部が、蛍光性物質、放射性物質または非放射性標識物質である1項に記載の方法。

【0016】

(4) 該非放射性標識物質がビオチンである3項に記載の方法。

(5) 該ラベル化試薬のアクセプター部が、核酸または核酸誘導体である1項に記載の方法。

(6) 該核酸誘導体が、核酸とアミノ酸またはアミノ酸誘導体とが結合した化合物である5項に記載の方法。

(7) 該核酸誘導体が、ピューロマイシンまたはピューロマイシン誘導体である5項または6項に記載の方法。

(8) 無細胞翻訳系が、大腸菌S30抽出液、小麦胚芽抽出液またはウサギ網状赤血球抽出液を使用する1項に記載の方法。

【0017】

(9) C末端がラベル化されたタンパク質と相互作用する分子の同定が蛍光の物理量変化によって行われる1項に記載の方法。

(10) 蛍光の物理量変化が蛍光の偏光、強度または時間依存である9項に記載

の方法。

(11) 相互作用する分子の同定が、蛍光偏光解消法または蛍光相関分光法によって行われる9項または10項に記載の方法。

(12) C末端がラベル化されたタンパク質と相互作用する分子の同定が、蛍光以外の物理量変化によって行われる1項に記載の方法。

(13) 相互作用する分子同定に、表面プラズモン共鳴装置を使用する12項に記載の方法。

(14) 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とがスパーサを介して結合したラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、コーディング領域を含むDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中で合成された、C末端がラベル化されたタンパク質が、センサーチップ上を被覆した、該タンパク質のラベル部に結合する物質に結合してなるセンサーチップに固定化された該タンパク質と相互作用する分子を、このチップを取り付けた表面プラズモン共鳴装置で、応答シグナルの時間変化を追跡することにより同定する13項に記載の方法。

(15) 相互作用する分子が、C末端がラベル化されたタンパク質である14項に記載の方法。

【0018】

(16) 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とがスパーサを介して結合したラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、コーディング領域を含むDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中で合成された、C末端がラベル化されたタンパク質が、メンブレンまたはマイクロプレート上を被覆した、該タンパク質のラベル部に結合する物質に結合してなるマイクロアレイを用いて該タンパク質と相互作用する分子を同定する1項に記載の方法。

(17) ラベル部がビオチンであり、アクセプター部がピューロマイシンであり、スパーサが高分子化合物であり、ラベル部に結合する物質がアビジンまたはストレプトアビジンである、14-16項のいずれか1項に記載の方法。

(18) 高分子化合物が、ポリエチレンまたはポリエチレングリコールである、  
17項に記載の方法。

(19) センサーチップ上のタンパク質に結合するタンパク質、核酸、糖類または脂質を検出する14項に記載の方法。

(20) マイクロアレイ上のタンパク質に結合するタンパク質、核酸、糖類または脂質を検出する16項に記載の方法。

(21) 該タンパク質、核酸、糖類または脂質の検出が固相酵素免疫検定法で行われる20項に記載の方法。

(22) 該タンパク質または核酸の検出が、該マイクロアレイにC末端が蛍光ラベル化されたタンパク質を加え、洗浄後蛍光イメージアナライザーを用いて行われる20項に記載の方法。

#### 【0019】

本発明の特徴は、プロモーター領域の制御下にあるコーディング領域を含有するDNAが、ピューロマイシンやそ誘導体などをアクセプター部として含むラベル化試薬の存在下無細胞翻訳系または生細胞系で転写して得られる、C末端がラベル化されたタンパク質を特別な精製を要せずして、そのまま直ちに、多様なタンパク質-分子解析装置に応用できることを明らかにしたことにある。

#### 【0020】

本発明の方法では、特定の翻訳されたタンパク質のC末端を特異的にラベルするので、通常の方法である、タンパク質を精製してからラベル化する方法に比べ、タンパク質の機能に影響を及ぼすことなく、しかも、迅速、簡易に、蛍光偏光解消法等の感度の良い装置により、大量の試料を扱うことが可能なハイスループット化システムを構築できる。

#### 【0021】

##### 【発明の実施の形態】

本発明のタンパク質-分子相互作用解析法は、無細胞翻訳系または生細胞でタンパク質のC末端を特異的にラベル化し、未反応のラベル化物質を除去し、相互作用する分子を加えることにより、蛍光偏光解消法等で測定する。

#### 【0022】

無細胞翻訳系または生細胞でタンパク質のC末端を特異的にラベル化するには、無細胞翻訳系または生細胞系にT7等のウイルスや細胞に由来するプロモーター領域の制御下にある、通常のDNAまたは終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物（加工mRNA）を鋳型として加え、最終濃度15-5 $\mu$ Mのピューロマイシンまたはピューロマイシン誘導体などのラベル化試薬の存在下でタンパク質合成を行わせ、翻訳タンパク質のC末端にラベル化物質を効率よく結合させ、高分子量タンパク質のC末端をラベル化する。コーディング領域は、任意のタンパク質、ペプチドをコードするDNAセグメントである。

## 【0023】

ピューロマイシンにフルオレセイン等の蛍光物質を化学結合させた化合物は、ピューロマイシンと同様、タンパク質のC末端の機能を損なうことなく翻訳タンパク質のC末端に結合するため、放射能物質を使用することなくタンパク質の同定が可能である。すなわち、無細胞翻訳系に蛍光化ピューロマイシン等のラベル化試薬を加え反応後、その反応生成物を電気泳動し、ゲルをそのまま蛍光イメージアナライザーで読み取ることにより、容易に翻訳タンパク質を同定できる。

## 【0024】

本発明のタンパク質のC末端がラベル化されたタンパク質は、加工されたDNAの転写産物（加工mRNA）を無細胞翻訳系または生細胞系に鋳型として加え、標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下でタンパク質合成を行わせて、製造される。

## 【0025】

プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物（加工されたmRNA）は、プロモーター領域と、終止コドンが削除されたコーディング領域とからなるDNAからRNAポリメラーゼを用いて転写することによって得られる。コーディング領域の長さは、特に問わない。この方法によれば、高分子量のタンパク質であっても効率よくそのC末端をラベル化できるので、ゲノム解析で得られるタンパク質の同定やそ

の機能解析にきわめて有用である。

【 0 0 2 6 】

本発明の方法では、まずラベル化試薬によりタンパク質のC末端がラベル化される。ラベル化試薬は、ラベル部とアクセプター部とから構成される。ラベル部は、通常、蛍光性物質、放射性物質および非放射性標識物質から選択される。ラベル部の蛍光物質としては、フルオレセイン系列以外にも、フリーの官能基（例えばカルボキシル基、水酸基、アミノ基など）をもち、スペーサーを介してピューロマイシンまたはピューロマイシン様化合物などのヌクレオチド誘導体に連結可能な種々の蛍光色素（例えば、ローダミン系列、エオシン系列、NBD系列など）であれば如何なるものであってもよい。

【 0 0 2 7 】

その他、ラベル部としては、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ のような放射性同位元素を含む標識物質、ピオチンのような補酵素、タンパク質、ペプチド、糖類、脂質類、色素、ポリエチレングリコールなどの非放射性標識物質、あるいはラベル化可能な化合物であれば、その化合物の種類、大きさを問わない。

【 0 0 2 8 】

ラベル化試薬を構成する別の成分であるアクセプター部としては、通常、核酸または核酸誘導体が使用される。核酸誘導体としては、核酸とアミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質が化学的に結合した化合物を使用できる。代表的な化合物として、アミド結合を有するピューロマイシン（Puromycin）、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド（3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside、PANS-アミノ酸）、たとえば、アミノ酸部がグリシンのPANS-Gly、アミノ酸部がバリンのPANS-Val、アミノ酸部がアラニンのPANS-Ala、その他、アミノ酸部が全ての各アミノ酸に対応するpans-アミノ酸化合物が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

また、化学結合として3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合して形成されるアミド結合で連結した3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド（3'-Aminoacyladenine aminonucleoside, AA



NS- アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンのAANS-Gly、アミノ酸部がバリンのAANS-Val、アミノ酸部がアラニンのAANS-Ala、その他、アミノ酸部が全アミノ酸の各アミノ酸に対応するAANS-アミノ酸化合物を使用できる。

## 【0030】

また、ヌクレオシドあるいはヌクレオチドとアミノ酸のエステル結合したものなども使用できる。さらにまた、核酸あるいは核酸に類似した化学構造骨格および塩基を有する物質と、アミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質とを化学的に結合した化合物は、すべてアクセプター部として使用できる。

## 【0031】

上記したピューロマイシンは、細菌 (Nathans, D (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51, 585-592; Takeda, Y. et al. (1960) J. Biochem. 48, 169-177) および動物細胞 (Ferguson, J. J. (1962) Biochim. Biophys. Acta 57, 616-617; Nemeth, A. M. & de la Haba, G. L. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1190-1193) のタンパク質合成を阻害することが知られている。ピューロマイシンの構造はアミノアシル tRNA の構造と類似しているため、リボソーム上の A サイトに入り、P サイトに存在しているペプチジル tRNA と反応し、ペプチジルピューロマイシンとしてリボソームから遊離する (Harris, R. J. (1971) Biochim. Biophys. Acta 240, 244-262)。

## 【0032】

タンパク質合成系において、終止コドンをもたない切断された mRNA を鋳型に用いた場合、タンパク質合成が停止することが知られている。このように、mRNA に対応するコドンがない場合は、アミノアシル-tRNA や終止因子はリボソーム上の A サイトに入ってもペプチド転移反応で触媒されない。一方、このような状態でもピューロマイシンやその他の誘導体は、リボソーム上の A サイトでリボソームのペプチド転移反応により触媒され、タンパク質の C 末端に効率よく結合できる。

## 【0033】

これを確かめるには、終止コドンをもつ mRNA と終止コドンをもたない mR

NA を作成し、蛍光性のピュロマイシン誘導体、たとえばフルオレセニルピュロマイシン (Fluorpuro) と共に無細胞翻訳系に加え、タンパク質 C 末端の蛍光ラベル化の効率を調べる。

【 0 0 3 4 】

タンパク質としては標準的な分子量をもつ  $\beta$ -ラクタマーゼ (分子量 32 kDa) の終止コドンのないものと、あるものの mRNA を調製するために、5' 側から T7 プロモーター、Kozak 配列 (コザック配列)、 $\beta$ -ラクタマーゼのコーディング領域、それと終止コドンのないものとあるものの遺伝子 DNA を作成した。

【 0 0 3 5 】

蛍光性のピュロマイシン誘導体としては、ラベル部としてフルオレセイン、アクセプター部としてピュロマイシンを選び、両者を化学結合で連結した蛍光性のラベル化化合物、例えば Fluorpuro を化学合成した。

【 0 0 3 6 】

真核生物の無細胞転写翻訳系、例えばウサギ網状赤血球抽出液 (Nuclease treated rabbit reticulocyte lysate) や小麦胚芽抽出液の翻訳系において、上記の T7 プロモーター、Kozak 配列、 $\beta$ -ラクタマーゼのコーディング領域、それと終止コドンのないものとあるものの DNA からの転写産物 (加工 mRNA) を鋳型として加え、Fluorpuro 存在下でタンパク質合成を行わせ、タンパク質の蛍光ラベル化について調べると、 $\beta$ -ラクタマーゼの全長タンパク質の C 末端に Fluorpuro が、16  $\mu$ M の濃度で明確に結合していることがわかった。

【 0 0 3 7 】

Fluorpuro による  $\beta$ -ラクタマーゼの全長タンパク質の蛍光ラベル化は、大腸菌の無細胞転写翻訳系でも確認された。特に、小麦胚芽抽出液の無細胞翻訳系を用いた場合、終止コドンのない mRNA の方が終止コドンのある mRNA に比べ、10 倍程度ラベル化効率が増大することが確認された。

【 0 0 3 8 】

さらに、Fluorpuro がタンパク質の相互作用を阻害しないことを確認

するために、IgG結合タンパク質のプロテインAの一部BドメインをFluoropuroで標識し、ヒトIgGとの解離常数を、蛍光偏光解消法を用いて調べた。その結果、Fluoropuroのラベル化は、結合能に影響を与えないことが分かった。このラベル法は、タンパク質のC末端を特異的に、かつ無細胞翻訳系という穏和な条件下で迅速に標識できるという利点を有する。

## 【0039】

ラベル化試薬の存在下、任意の無細胞翻訳系または生細胞で翻訳されラベル化されたタンパク質は、生細胞の場合は溶解後、ゲル濾過等（例えば、Bio-Spin 6, BIO-RAD社製）によって未反応のラベル化試薬を除去する。

## 【0040】

蛍光偏光解消法では、蛍光ラベル化された分子に直線偏光を入射し、散乱される光の偏光度を測定することにより、蛍光ラベル化分子の回転ブラウン運動の程度を測定する（Perran J. (1926) *Phy. Rad.* 1: 390-401）。この方法によれば、夾雑物があってもこれに影響されることなく、蛍光ラベル化された分子と相互作用する分子の挙動を追跡できる。これは、蛍光ラベル化された分子と添加した分子とが相互作用するときのみ、偏光度の変化として測定されるからである。

## 【0041】

蛍光偏光解消法により、タンパク質-分子相互作用を調べるに際し、未反応の蛍光ラベル化試薬を除去後、ラベル化タンパク質を含む試料は、そのまま蛍光分光計で、ラベル化タンパク質の濃度を測定できる。その際、ラベル化タンパク質の濃度を0.1から1 nM程度にして、相互作用を調べようとする未標識のタンパク質等の分子の濃度が0.01 nMから10  $\mu$ Mであるサンプルを作成し、これを加えることによって生じる、蛍光偏光度の違いから、相互作用の有無を確認できる。

## 【0042】

蛍光相関分光法では、共焦点レーザー顕微鏡下で、相互作用する分子との共存下、蛍光ラベル化分子1分子の並進ブラウン運動の変化を調べることにより、相互作用の有無を確認できる（Eigen, M. and Rigler, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5740-5747）。

## 【0043】

蛍光相関分光法を利用してタンパク質-分子相互作用を調べるには、未反応の蛍光ラベル化試薬を除去したラベル化タンパク質を含む試料の濃度を蛍光分光計で測定後、該サンプルを蛍光相関分光装置のレーザの共焦点位置に置き、さらに相互作用を調べようとする未標識のタンパク質等の分子、または、異なる蛍光波長をもつ蛍光物質でラベルしたタンパク質等の分子をラベル化タンパク質と同程度の濃度で加え、蛍光ラベル化分子-分子の並進ブラウン運動の時間的变化を追跡する。

## 【0044】

表面プラズモン共鳴装置は、金属/液体界面で相互作用する分子によって表面プラズモンが励起され、これを反射光の強度変化で測定する装置である(Cullen DC, Brown RG, Lowe CR (1987-88) Biosensors 3(4):211-225)。表面プラズモン共鳴装置を使用して、タンパク質-分子相互作用を調べるには、標識物質としてスパーサ分子（ポリエチレン、ポリエチレングリコール等の高分子物質）を介して結合したビオチンを有するラベル化試薬の存在下、タンパク質を翻訳し、そのC末端をビオチン化する。未反応のビオチン化ラベルを除去した後、これをアビジンまたはストレプトアビジンがコートされたセンサーチップ上に結合させる。センサーチップ上に固定化されたタンパク質と相互作用する分子は、このチップを取り付けた表面プラズモン共鳴装置で、応答シグナルの時間変化を追跡することにより同定できる。

## 【0045】

マイクロアレイ(Schena M, et al., (1998) Trend Biotechnol 16(7) 301-306)は、標識物質としてスパーサ分子（ポリエチレン、ポリエチレングリコール等の高分子物質）を介してビオチンを有するラベル化試薬の存在下でタンパク質を翻訳し、未反応のビオチン化ラベルを除去した後に、スパーサ分子を介してC末端をビオチン化したタンパク質1をストレプトアビジンまたはアビジンでコートしたメンブレン、マイクロプレート等の特定の位置に固定化することにより作成する(図1参照)。

## 【0046】

既に記載した方法でC末端をビオチン化したタンパク質2と、アレイの上に固定化されている上記した特定のタンパク質1とを相互作用させ、洗浄後、アルカリホスホターゼ融合ストレプトアビジンを加えてタンパク質2のC末端ビオチンと結合させ、さらに、アルカリホスホターゼの基質を加えることによって生じる化学発光をX線フィルム、バイオイメージ装置等で測定し、相互作用を同定できる(図1参照)。これに類する化学発光法は、本発明の方法において、全て利用可能である(Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) *Immunochem.* 8, 871-873; Prentice, G.A. and Merrill, A.R. (1999) *Anal Biochem.* 272, 216-223)。

【0047】

#### 【実施例】

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、その要旨を越えない限り、以下の実施例によって限定されるものではない。

#### 実施例

蛍光偏光解消法を用いたC末端ラベル化プロテインAの一部BドメインとヒトIgGとの相互作用の解析

【0048】

<1>Bドメインをコードした転写用DNAの構築とそのmRNAの構築

材料: プロテインAを載せたpRIT2Tプラスミドは、New England Biolab. 社製(以下、NEBと略す)である。E. coli pARベクター(Rosenberg, A.H. et.al. 1987, *Gene* 56, 125-135)のT7プロモーターとKozak共通配列及びシャイン・ダルガーノ(Shine-Dalgarno)配列を含むDNAは日本製粉で、PCR用DNAプライマーは、エスベックオリゴサービスによってそれぞれ合成された。

各種酵素、試薬等は市販のものを用いた: 耐熱性DNA合成酵素 TaKaRa Ex Taq Polymerase (Takara Shuzou 社製); RNA合成酵素キット Ribomax Large Scale RNA Production System (Promega 社製); キャップアナログ RNA capping Analog (Gibco BRL 社製); 無細胞翻訳系キット大腸菌S30抽出液 (Promega 社製); ヒトIgG (SIGMA)

A社製) ; 電気泳動試薬、アクリルアミド、ビスアクリルアミド、SDS等はすべてナカライテスク製; プライマー除去剤 Primer Remover (Edge Biosystems社製)。

【0049】

方法: 転写効率の高い大腸菌ウイルスT7のRNAポリメラーゼによって認識されるDNA配列(T7プロモーター配列)と翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識されやすい配列(Kozakコンセンサス配列)と原核細胞のリボソームによって認識されやすい配列(シャイン・ダルガーノ配列)を有し、その下流にプロテインAのBドメインをコードしたDNAを、次のようにして構築した。

【0050】

まず、T7プロモーター配列とKozakコンセンサス配列及びシャイン・ダルガーノ配列を有する領域とBドメインを有する領域を独立して作成した。T7プロモーター配列とKozakコンセンサス配列及びシャイン・ダルガーノ配列を含む1本鎖DNA(配列番号1)を有機合成し、DNAプライマー(配列番号2)とBドメインの一部をコードしたプライマー(配列番号3)によってポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。

【0051】

一方、プロテインA遺伝子を載せたpRIT2Tプラスミドを鋳型として配列番号1の一部をコードしたプライマー(配列番号4)とDNAプライマー(配列番号5)を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、ドメインBをコードしたDNA領域を増幅する。これらの2つのPCR産物を重複伸長(Overlap extension)法(Horton RM, et al. (1989) Gene 77, 61-68)に従って、結合させ、2つのDNAプライマー(配列番号2および配列番号5)でPCRすることによりドメインBを作成した。

【0052】

上記した方法で作成したDNAを、反応液100  $\mu$ l 当たり10  $\mu$ gの割合で加え、RNA合成キット Ribomax Large Scale RNA Production System (Promega社製)を使ってmRNAに転写した。翻訳効率を上げるためにキャップアナログ (RNA cap

ping Analog; Gibco BRL社製) を最終濃度が7.2 mMになるように加え、mRNAの5'側を修飾した。キャップアナログおよび過剰のNTP (ヌクロオチド3リン酸) を除去するために、プライマー除去剤 (Edge Biosystems 社製) を使ってエタノール沈殿を行なった。

【0053】

<2>蛍光ラベル化試薬Fluorescein-puromycin (以下、Fluorpuro と略す) の調製

材料: ピューロマイシン(puromycin) はSigma 社製、フルオレダイト(6-N-carboxy-di-O-pivaloyl-fluorescein-hexyl-O-(2-cyanoethyl)-(N,N'-diisopropyl)-phosphoamidite)は日本パーセプティブ社から、テトラゾールは日本ミリポア社から、クロマト用シリカゲルはメルク社からそれぞれ購入した。

【0054】

方法: ピューロマイシン (26 mg、48  $\mu$ mol) を3 mlの乾燥ピリジンに溶かし、減圧下で蒸発させ、脱水させた。この操作を3回繰り返した。これに5 mlの4% テトラゾール/ アセトニトリル溶液とフルオレダイトを加え、室温で攪拌させた。反応はシリカゲルの薄層クロマトグラフィー (TLC、展開溶媒: クロロホルム: メタノール=9:1) でモニターした。通常、反応は2時間で終了する。反応後、溶媒を減圧下で追い出し、これに0.1 M のヨウ素をテトラヒドロフラン/ ピリジン/ 水=80:40:2に溶かした溶液2 mlを加え、室温で攪拌させながら生成したホスファイトートリエステルを酸化させた。

【0055】

1時間半後、溶媒を減圧下で除去し、残部をクロロフォルムで抽出した。抽出液は無水硫酸マグネシウム存在下で乾燥させ、溶媒を除去した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム/ メタノール=90:10で溶出させた。保護基のついたFluorpuro はシリカゲルTLC (展開溶媒: クロロホルム: メタノール=9:1) でRf 0.26のところに溶出された。次に保護基の脱保護を行なった。

【0056】

保護基のついたFluorpuro を濃アンモニア水/ エタノール = 2 : 1 の混合溶液 1 ml に加え、 $\beta$ -シアノエチル基を除去するとFluorpuro が 7 mg 得られた。合成物がFluorpuro であることは、その pH 9 の溶液の紫外可視吸光スペクトルが 272 nm (ピューロマイシン部由来) と 494 nm (フルオレセイン部由来) に現れることならびに、MALDI/TOF マススペクトロメトリーで、分子イオンが  $m/z$  1010 に現れることから同定された。

【0057】

### <3>タンパク質のラベル化

作成した mRNA は、E.coli S30 抽出物 (Promega 社製) の翻訳系においてフルオロピューロマイシン (Fluorpuro) の最終濃度が 16 mM になるように加え、37°C で 60 分反応させた。未反応の Fluorpuro を取り除くために、25 ml の TBS 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) で平衡化した PD-10 カラム (BIO-RAD 社製) で溶出する。最初の 1.6 ml のフラクションにラベル化された B ドメインが溶出した。電気泳動で確認するためには、さらに Centricon 3 (アミコン社製) で遠心し、130  $\mu$ l 程度まで濃縮した。

【0058】

### <4>タンパク質のラベル化の確認

フルオロピューロマイシン (Fluorpuro) でラベル化されたタンパク質の確認は、上記のサンプルを用いて Schagger らの方法 (Schagger H and von Jagow G., (1987) Anal Biochem. 166, 368-379) で SDS-PAGE で 20 V 定電圧、120 分泳動したゲルを蛍光イメージング装置 (FluorImager 595, Molecular Dynamics) で直接読み取ることにより行った。さらに、pH 9 の溶液中で 494 nm の吸光度から求めたフルオレセインを指標として、蛍光分光光度計 (島津 RF-502) を使用してラベル化されたドメイン B タンパク質の濃度を測定した。

【0059】

### <5>蛍光偏光解消測定装置によるドメイン B とヒト IgG との相互作用の解析

ラベル化されたドメイン B タンパク質濃度を 0.1 から 1 nM 程度にして、ヒト IgG を 10 段階に希釈することで、0.01 nM から 10  $\mu$ M の濃度のサンプルを作成し、これに加えた。30 分、室温で静置した後、蛍光偏光解消測定装置 (BEACON20



00, PanVera 社) によって、その偏光度を測定した。各ヒトIgG の濃度に対する偏光度のグラフが図2 である。この測定値に基づき、解離定数をもとめた結果、 $KD=6.4 \times 10^{-8}$ であった。これは、既知のデータと良く一致した。

## 【0060】

タンパク質として標準的な分子量をもつ  $\beta$ -ラクタマーゼをラベル化のモデルとして使用した。この  $\beta$ -ラクタマーゼの mRNA を作成するにあたり、終止コドンのあるものとなないものを調整し、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球の2種類の無細胞翻訳系でタンパク合成した。合成された  $\beta$ -ラクタマーゼタンパク質が蛍光ラベルされたことを確認するために、翻訳産物を SDS-PAGE で泳動し、蛍光イメージアナライザーを使って画像化した。この結果、特に、小麦胚芽系の無細胞翻訳系を使用した場合、mRNA の終止コドンを欠失させたものは、欠失させないものに比べて10倍程度ラベル化効率が增大することを確認した。

## 【0061】

## 【発明の効果】

本発明により、原核細胞と真核細胞とを問わず無細胞翻訳系および生細胞を利用して翻訳合成されたタンパク質のC末端を効率よく蛍光等によりラベル化することが可能になった。本発明は、遺伝子から発現されるタンパク質の同定と、それらの相互作用などの機能解析をより迅速に、安全かつ経済的に実施することを可能にする。

## 【0062】

その他、本発明の方法で得られるC末端がラベル化されたタンパク質は、該タンパク質と結合するかあるいは相互作用し、その活性を阻害または活性化する化合物の同定にも有用である。すなわち、本発明の方法で得られるC末端がラベル化されたタンパク質を、スクリーニングしようとする化合物と結合ないし相互作用させ、残存または消失する該タンパク質のC末端ラベルを検出する等の方法により該化合物を同定できる。

## 【0063】

本発明の方法では、C末端が蛍光等でラベル化されたタンパク質は、他のタンパク質や核酸への結合に影響を与えないので、タンパク質の機能に影響を及ぼす

ことなく、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-核酸相互作用を測定できる。

【0064】

また、特定の翻訳されたタンパク質のC末端が特異的にラベル化されるので、タンパク質を精製してからラベル化する、通常の方法に比べ、迅速、簡易に、蛍光偏光解消法等の感度の良い装置により、大量の試料を扱うためのハイスループット化のシステムを構築できる。このように、本発明により、C末端が蛍光等でラベル化されたタンパク質と蛍光偏光解消法などの感度の良い解析装置とを組み合わせることにより、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-核酸相互作用などの解析を目的とするゲノム機能解析のハイスループット化が可能になる。さらに、本発明により、ハイスループット化に有利なタンパク質のマイクロアレイの作成が可能となった。

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> A method of analyzing protein-molecule interaction

<130> J04120

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 1

gatcccgcgga aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat 60

aattttgttt aactttaaga aggagatgcc accatggttg agccccgcat ggagttc 117

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 2

ggccccgcga aattaatacg actcactata g

31

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 3

tgttgaattt gttatccatg gtggcatctc cttcttaaag

40

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 4

ctttaagaag gagatgccac catgg

25

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 5

gttgaattcg ttgtcagctt ttggtgcttg a

31

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 - 5 : 合成 DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】

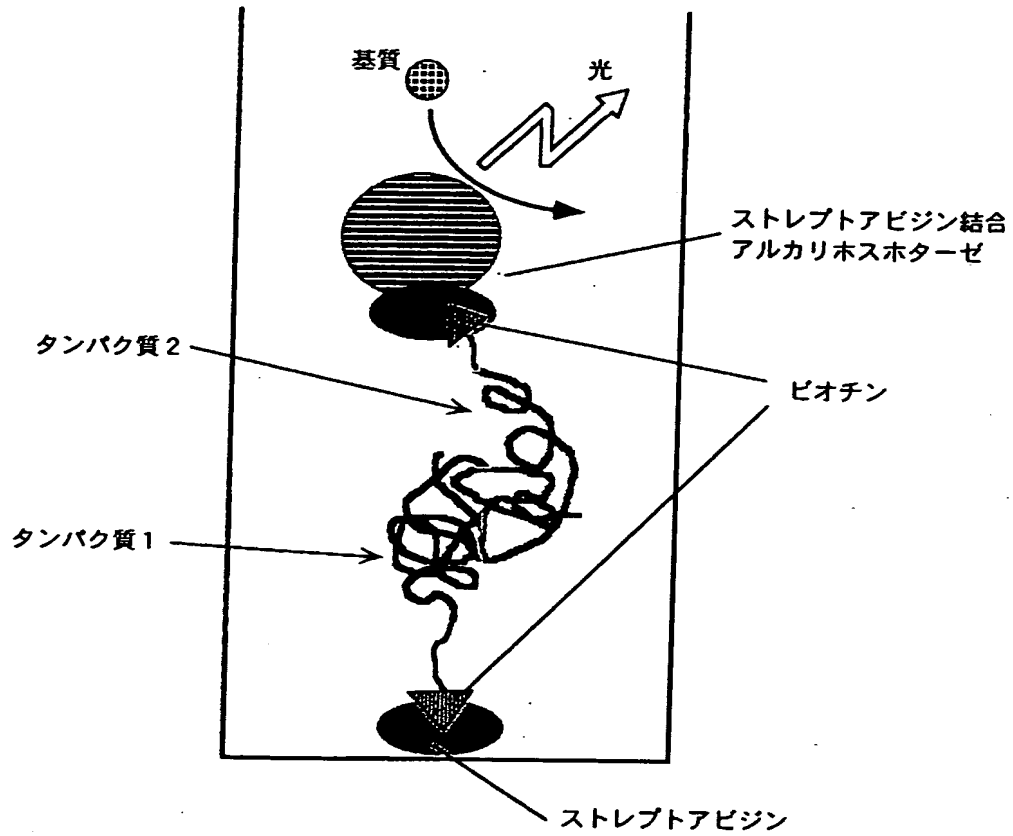
スパーサを介してタンパク質 1 の C 末端に結合したビオチンが、メンブレンまたはマイクロプレート上を被覆したアビジンまたはストレプトアビジンに結合してなる本発明のマイクロアレイにおいて、タンパク質 1 と相互作用するタンパク質 2 の C 末端に結合したビオチンがストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼに結合し、さらにアルカリホスファターゼの基質を加えることによって生じる化学発光を表す模式図である。

【図 2】

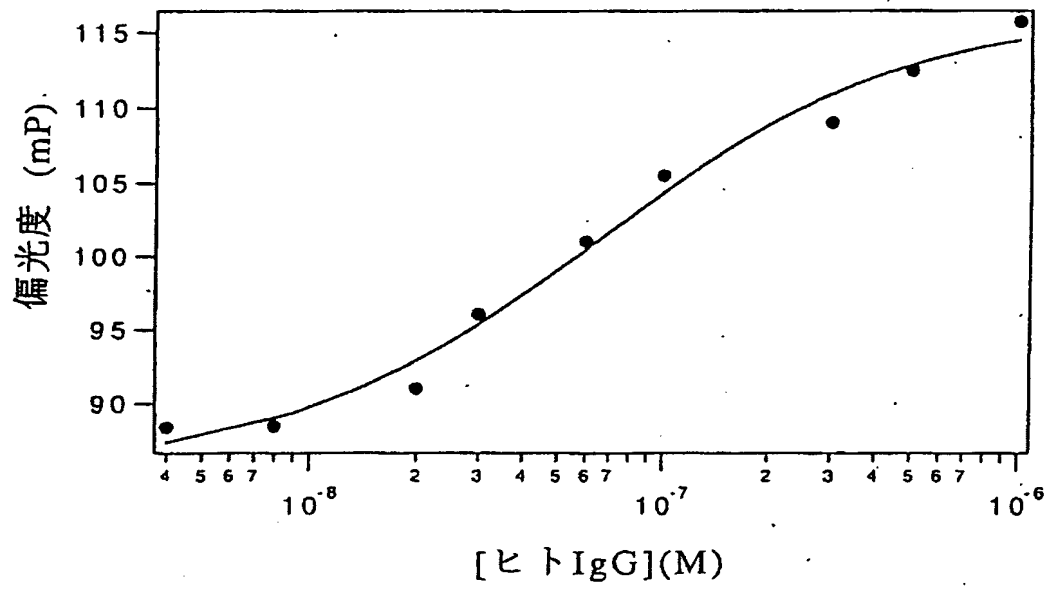
実施例での蛍光偏光解消測定装置によるドメイン B とヒト IgG の相互作用解析において、各ヒト IgG の濃度に対する偏光度のグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質・タンパク質相互作用やタンパク質・核酸相互作用を解析して、遺伝子やタンパク質の機能を効率よく自動化して解析するに適した方法および該方法の実施に使用されるマイクロアレイやセンサーチップの提供。

【解決手段】 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、コーディング領域を含むDNA から転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中で合成される、C 末端がラベル化されたタンパク質を用いて、該タンパク質と相互作用する分子を同定する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日	1994年10月20日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名	三菱化学株式会社